

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-208662  
(P2004-208662A)

(43) 公開日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**C 12 N 15/09**  
**A01K 67/027**  
**A61K 45/00**  
**A61P 3/06**  
**A61P 3/10**

F 1

C 12 N 15/00  
A01K 67/027  
A61K 45/00  
A61P 3/06  
A61P 3/10

テーマコード(参考)

2 G 04 5  
4 B 02 4  
4 B 06 3  
4 B 06 5  
4 C 08 4

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2003-2668(P2003-2668)

(22) 出願日

平成15年1月8日(2003.1.8)

(71) 出願人

591108880  
国立循環器病センター総長

大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号

(71) 出願人

000003311

中外製薬株式会社  
東京都北区浮間5丁目5番1号

(74) 代理人

100102978

弁理士 清水 初志

(74) 代理人

100108774

弁理士 橋本 一憲

(72) 発明者

沢村 達也

大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号 国立

循環器病センター内

(72) 発明者

鈴木 宏志

北海道帯広市西18条南2丁目2番56号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L O X - 1 遺伝子欠損動物

## (57) 【要約】

【課題】 L O X - 1 遺伝子対の発現が不活性化された遺伝子改変動物を得ることができれば、個体レベルで L O X - 1 の生理機能を解明することができ、該遺伝子に関連した、動脈硬化等を含む疾患の治療薬等の研究に利用することも可能となる。

【解決手段】 遺伝子ターゲティング法により L O X - 1 遺伝子欠損マウスを作製した。作製された L O X - 1 遺伝子欠損マウスを用いた解析により、L O X - 1 アンタゴニストは内皮機能が低下している病態の改善に有用であることが明らかとなった。また、原虫の感染にあっても L O X - 1 が関与していることが明らかとなった。このように、本発明の L O X - 1 遺伝子欠損動物は、L O X - 1 の新規機能を明らかにしていくために有用なモデル動物である。また、本発明の L O X - 1 遺伝子の機能がノックアウトされたマウスは、動脈硬化の発症、進展、その他未知の L O X - 1 遺伝子の役割を探る上で有用なモデルマウスとなる。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

L O X - 1 遺伝子の発現が抑制されたE S 細胞。

**【請求項2】**

L O X - 1 遺伝子対の一方または両方の遺伝子が欠損されることによりL O X - 1 遺伝子の発現が抑制されている、請求項1記載のE S 細胞。

**【請求項3】**

遺伝子の欠損が外来遺伝子の挿入によるものである、請求項1記載のE S 細胞。

**【請求項4】**

E S 細胞がげっ歯類由来の細胞である、請求項1記載のE S 細胞。 10

**【請求項5】**

L O X - 1 遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物。

**【請求項6】**

L O X - 1 遺伝子対の一方または両方の遺伝子が欠損されることによりL O X - 1 遺伝子の発現が抑制されている、請求項5記載の非ヒト動物。

**【請求項7】**

遺伝子の欠損が外来遺伝子の挿入によるものである、請求項5記載の非ヒト動物。

**【請求項8】**

非ヒト動物がげっ歯類である請求項5記載の非ヒト動物。

**【請求項9】**

以下の工程を含む L O X - 1 アゴニスト及び／または促進剤のスクリーニング方法、 20

(1) 請求項5～8のいずれか1項に記載の非ヒト動物に対しバベシア原虫を感染させる工程

(2) (1)の動物に被験物質を投与する工程

(3) 原虫による感染症の症状を緩和させる被験物質を選択する工程

**【請求項10】**

L O X - 1 アゴニスト及び／若しくは促進剤、または発現促進剤を有効成分とする原虫感染症治療用組成物。

**【請求項11】**

L O X - 1 アンタゴニスト及び／若しくは阻害剤、またはL O X - 1 発現抑制剤を有効成分とする虚血性疾患、高脂血症、糖尿病及び高血圧病治療用組成物。 30

**【請求項12】**

L O X - 1 アンタゴニスト及び／若しくは阻害剤、またはL O X - 1 発現抑制剤を有効成分とする抗炎症剤。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、L O X - 1 遺伝子がノックアウトされた細胞及び動物、並びに、それらの利用に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

血管内皮細胞の機能異常は、動脈硬化を含む種々の病態との密接な関係を有する。動脈硬化、高血圧、及び糖尿病のモデル動物、並びに、患者の血管で観察される血管弛緩作用の低下は、血管内皮細胞からの一酸化窒素(N O)放出の減少が原因であると考えられている。また、動脈硬化巣でよく見られるマクロファージの浸潤には、血管内皮細胞からの遊走因子の分泌、接着因子の発現上昇が関与することが知られている。種々の刺激がこれらの内皮細胞の変化に関与していると考えられるが、酸化された低密度リポ蛋白質(L D L : low density lipoprotein)により上述のような内皮細胞の変化が誘導されることが既に示されており、注目を集めている(Oka K. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 50

9535-40; Kakutani M. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 360-4).

#### 【0008】

酸化LDL(以下、OXLDL)受容体(LOX-1: lectin oxidized low density lipoprotein receptor-1)は、血管内皮細胞におけるOXLDL受容体の一つとしてクローニングされ(Sawamura T. et al. (1997) Nature 386: 78-7)、マクロファージ及び血管内皮細胞に存在することが明らかにされている。LOX-1は、血管内皮細胞において、OXLDL、並びに、高脂血症、高血圧、及び糖尿病等の動脈硬化関連因子により発現が誘導され、動脈硬化巣においてはその発現が進していることが示されている。LOX-1を介したOXLDLの取り込みが内皮細胞死を誘導することは公知の事実である。ヒトLOX-1遺伝子の構造解析及びLOX-1の生理的リガンドの同定も既に行われている。また、OXLDLによる内皮細胞におけるNO産生不全が高親和性アルギニン輸送の阻害および活性酸素の産生に起因することが示されている。さらに、LOX-1に対する中和抗体を用いた実験から、LOX-1アントゴニストが、動脈硬化等の疾患に有効である可能性も示唆されている。

10

#### 【0004】

マクロファージの異物認識・取込みの機構には免疫機構を介した機構、及び介さない機構が知られている。後者の免疫機構を介さない機構は、スカベンジャー機構とも呼ばれ、その代表的な受容体としてI型、II型クラスAマクロファージスカベンジャー受容体(SR-AI/II)が知られている。LOX-1もSR-AI/IIと同じくスカベンジャー受容体ファミリーに属する蛋白質である。SR-AI/IIについては、動脈硬化の発症及び進展、病原微生物の感染防御、異物老廃物の除去、原虫感染症に関与していることが報告されている(Nature 386: 292 (1997); J. EXP. Med. 191: 147 (2000); J. EXP. Med. 186: 1481 (1997); J. Protozool. Res. 7: 81 (1997); Am. J. Trop. Med. Hyg. 59: 848 (1998))。従って、LOX-1もSR-AI/IIと同様に、これらの疾患及び感染症に関与している可能性が考えられる。

20

#### 【0005】

##### 【非特許文献1】

Sawamura T. et al. (1997) Nature 386: 78-7

30

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

LOX-1遺伝子対の発現が不活性化された遺伝子改変動物を得ることができれば、個体レベルでLOX-1の生理機能を解明することができ、該遺伝子に関連した、動脈硬化等を含む虚血性疾患の治療薬等の研究に利用することも可能となる。また、このようなLOX-1遺伝子の機能がノックアウトされたマウスは、動脈硬化の発症、進展、その他未知のLOX-1遺伝子の役割を探る上で有用なモデルマウスとなる。

40

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

そこで、LOX-1遺伝子の機能を探るために、LOX-1遺伝子欠損マウス(以下、LOX-1KOマウス)の作製を試みた。様々な検討を行い、本明細書の実施例において示したようにマウスLOX-1遺伝子をクローニングして相同組換え用のベクターを構築し、該ベクターを用いた相同組換えにより変異LOX-1遺伝子を持つES細胞を樹立し、キメラを作製し、ヘテロ欠損マウスを交配することによりホモ欠損マウスを得ることに成功した。該マウスを使用することにより、以下の機能を確認することができた。

#### 【0008】

##### (1) 感染における機能

50

L O X - 1 遺伝子欠損 (K O) マウスに対する Babesia rodhaini 感染実験を行った。その結果、Babesia rodhaini ( $10,000$  IRBC (infected red blood cell; 感染赤血球)) 感染後の生存率について、K O マウスと野生型マウスとの間に差は認められなかつたが、パラシテミアのより早期且つ急速に上昇する傾向、及びヘマトクリット値の有意な減少が K O マウスで観察された。また、K O マウスに対する Babesia microti ( $1 \times 10^7$  IRBC) 感染においては、野生型マウスでは 2 峰性のパラシテミアのピークを示すのに対し、K O マウスでは 3 峰性に推移することが観察された。ヘマトクリット値の推移には野生型マウスとの差は認められなかつた。以上、マラリアと同様に赤血球に寄生するバベシア原虫の感染実験により、L O X - 1 のこの原虫感染症への関与を示唆する成績が得られた。

10

## 【0009】

## (2) 血管内皮機能

血管収縮物質であるプロstagランジン F (PGF)  $2\alpha$  とアセチルコリンを用い、本発明のマウスにおいて血管内皮機能評価を行い、OXLDL の内皮機能傷害作用が L O X - 1 を介したシグナルに基づくことが明らかとなつた。そして、L O X - 1 アンタゴニスト及び／または阻害剤は内皮機能を 進すと考えられ、L O X - 1 アンタゴニストが内皮機能の低下した病態の改善に有用であることが示された。

## 【0010】

## (3) 炎症における機能

L O X - 1 遺伝子欠損 (K O) マウス及び正常マウスにおけるカラゲニン足浮腫に対する作用を検討し、浮腫率及び病理組織所見から、L O X - 1 遺伝子がノックアウトされたマウスでは正常マウスに比べ炎症反応が抑制されることが示された。

20

## 【0011】

その結果、L O X - 1 アンタゴニスト及び／または阻害剤が虚血性疾患、高脂血症、糖尿病、及び高血圧病を処置するのに有用であること、並びに、L O X - 1 のアゴニスト及び／または促進剤が原虫感染症を処置するのに有用であることが判明した。また、L O X - 1 遺伝子を欠損するトランスジェニック動物を利用することにより、これら有用なアンタゴニスト及び／または阻害剤、並びに、アゴニスト及び／または促進剤をスクリーニングし得ることを思い至り、本発明を完成した。本発明はより詳細には、

30

〔1〕 L O X - 1 遺伝子の発現が抑制された E S 細胞、

〔2〕 L O X - 1 遺伝子対の一方または両方の遺伝子が欠損されることにより L O X - 1 遺伝子の発現が抑制されている、上記〔1〕記載の E S 細胞、

〔3〕 遺伝子の欠損が外来遺伝子の挿入によるものである上記〔1〕記載の E S 細胞、

〔4〕 E S 細胞がげっ歯類由来の細胞である、上記〔1〕記載の E S 細胞、

〔5〕 L O X - 1 遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物、

〔6〕 L O X - 1 遺伝子対の一方または両方の遺伝子が欠損されることにより L O X - 1 遺伝子の発現が抑制されている、上記〔5〕記載の非ヒト動物、

〔7〕 遺伝子の欠損が外来遺伝子の挿入によるものである、上記〔5〕記載の非ヒト動物、

40

〔8〕 非ヒト動物がげっ歯類である上記〔5〕記載の非ヒト動物、

〔9〕 以下の工程を含む L O X - 1 アゴニスト及び／または促進剤のスクリーニング方法、

(1) 上記〔5〕～〔8〕のいずれかに記載の非ヒト動物に対しバベシア原虫を感染させる工程

(2) (1) の動物に被験物質を投与する工程

(3) 原虫による感染症の症状を緩和させる被験物質を選択する工程

〔10〕 L O X - 1 アゴニスト及び／または促進剤を有効成分とする原虫感染症治療用組成物、

〔11〕 L O X - 1 アンタゴニスト及び／若しくは阻害剤、または L O X - 1 発現抑制物質を有効成分とする虚血性疾患、高脂血症、糖尿病及び高血圧病治療用組成物、並びに

50

【12】LOX-1アンタゴニスト及び／若しくは阻害剤、またはLOX-1発現抑制物質を有効成分とする抗炎症剤に関するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の遺伝子改変ES細胞及び遺伝子改変動物は、LOX-1遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする。LOX-1遺伝子は、スカベンジャー受容体の一つとして既にクローニングされている（Sawamura T. et al. (1997) Nature 388: 78-7）。マウスLOX-1遺伝子の塩基配列、及びそれにコードされる蛋白質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1及び2として示す。

10

【0013】

本発明においてLOX-1遺伝子の改変の対象となる動物は、特に限定されないが、好ましくはマウス、ラット、ハムスター等のげっ歯類である。特に、動物モデルとして用いることを考慮する場合には、マウスが好ましい。また、LOX-1遺伝子の改変の対象となるES細胞も特に限定されないが、げっ歯類、中でもマウスに由来するものが好ましい。ES細胞は、周知の方法により取得し、維持することができます（Doetschman et al. (1985) J. Embryol. EXP. Morphol. 87: 27-45参照）。

【0014】

ここで、「LOX-1遺伝子の発現が抑制された」とは、LOX-1遺伝子対の両方の発現が抑制された完全な抑制（又は対立遺伝子）の他、遺伝子対の一方の発現のみが抑制された不完全に抑制された状態を含むものである。本発明においては、LOX-1遺伝子の発現が特異的に抑制されていることが好ましい。本発明の遺伝子改変ES細胞及び動物において、LOX-1遺伝子の発現を人為的に抑制する手段としては、LOX-1遺伝子を欠損させる方法及びLOX-1遺伝子の発現制御領域を欠損させる方法を挙げることができます。内在性遺伝子及び発現制御領域の欠損方法としては、遺伝子ターゲティングが考えられるが、好ましくはLOX-1遺伝子対の一方または両方に外来遺伝子を挿入して遺伝子を不活性化する方法を挙げることができます。

20

【0015】

LOX-1遺伝子の発現制御領域は、例えば、LOX-1の塩基配列を利用してゲノムDNAから公知の方法により得ることができます。S1マッピングのような転写開始点を特定する方法（細胞工学別冊8 新細胞工学プロトコール、東京大学医科学研究所制癌研究部編（1998）862～874頁、秀潤社）が利用可能である。一般に遺伝子の発現制御領域は、5'末端の15～100bp、好ましくは30～50bpをプローブDNAとしてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、得られたポリヌクレオチドを短縮化または断片化し、レポーター遺伝子を利用してその発現能を調べることにより取得することができます。さらに、Neural Network <http://www.fruitfly.org/seq-tools/Promoter.html>; Rees et al. (1996) Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium. Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co. 等の遺伝子の発現制御領域を予測するためのプログラム、及び、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム（<http://biosci.cbs.unsw.edu.au/software/ProScan/PromoterScan.htm>）も公知であり、利用することができます。

30

40

【0016】

本発明の遺伝子改変マウスは、例えば、以下のようにして作成することができます。まず、マウスから真正LOX-1遺伝子のエクソン部分を含むDNAを単離し、このDNA断片に適当な遺伝子を挿入し、ターゲティングベクターを構築する。DNA断片に挿入する遺伝子としては、例えば、該ベクターの導入を確認することができる、抗生物質耐性遺伝子

50

(ネオマイシン耐性遺伝子等)のマーカー遺伝子の使用が考えられる。抗生物質耐性遺伝子を用いた場合には、細胞を抗生物質を含む培地中で培養することにより細胞に該ベクターが導入されたかどうかを確認することができる。ターゲティングベクターは、細胞中に挿入されることにより天然のLOX-1遺伝子の転写を妨げるか、または、阻止するようにゲノムDNAへと相同組換えにより組込まれる。次に、該ベクターをエレクトボーレーション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法等によりES細胞株に導入し、相同組換えを生じた細胞株を選抜する。さらに効率的な組換え細胞の選抜を行うために、ターゲティングベクターにチミジンキナーゼ遺伝子等を結合させておくことにより、非相同組換えを起こした細胞株を排除することができる。また、ターゲティングベクターにジフェリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子等を結合させ、非相同組換えを起こした細胞株を排除する方法も知られており、本発明の変異細胞または動物を作製する際に用いることができる。また、PCR及びササンプロットにより相同組換え検定を行い、LOX-1遺伝子の遺伝子対の少なくとも一方が不活性化された細胞株を効率的に得ることもできる。

#### 【0017】

相同組換えを生じた細胞株を選抜する場合、相同組換えの箇所以外における遺伝子挿入による遺伝子破壊の恐れもあるため、複数のクローンを用いてキメラの作製を行うことが好ましい。得られたES細胞株をマウス盤胞にインジェクションしてキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスを交配させることで、LOX-1遺伝子の遺伝子対の一方を不活性化したマウスを得ることができる。さらに、このマウスを交配させることで、LOX-1遺伝子対の両方を不活性化したマウスを得うことができる。ES細胞が樹立されているマウス以外の動物においても、同様の手法により、LOX-1遺伝子改変細胞及び動物を得ることができる。

#### 【0018】

また、LOX-1遺伝子の遺伝子対の両方が不活性化されたES細胞株は、以下の方法によつても取得することができる。即ち、遺伝子対の一方を不活性化したES細胞株を高濃度の抗生物質を含む培地で培養することにより、遺伝子対のもう一方も不活性化された細胞株、つまり、LOX-1遺伝子の遺伝子対の両方が不活性化されたES細胞株を得ることができます。また、遺伝子対の一方を不活性化したES細胞株を選抜し、この細胞株に再度ターゲティングベクターを導入し、相同組換えを生じた細胞株の選択することによっても、LOX-1遺伝子の遺伝子対の両方が不活性化されたES細胞株を得ることができます。再度の相同組換えを行う場合には、ターゲティングベクターに挿入するマーカー遺伝子を、一回目の相同組換え用と二回目の相同組換え用とで異なるものを使用することが好ましい。

#### 【0019】

本発明の遺伝子改変動物由来の細胞株を樹立する方法としては、公知の方法を用いることができる。例えば、げっ歯類においては、胎仔細胞の初代培養の方法を用いることができる(新生化学実験講座、18巻、125~129頁、東京化学同人;マウスの操作マニュアル、262~264頁、近代出版等参照)。

#### 【0020】

本発明のLOX-1遺伝子欠損マウスを用いた解析により、LOX-1の血管内皮機能、原虫感染及び炎症反応との関連が示された(実施例6~8参照)。従って、LOX-1遺伝子欠損動物は、LOX-1遺伝子の詳細な機能の解析に利用できるだけではなく、高脂血症、糖尿病、高血圧病、及び虚血性疾患等の血管内皮機能の低下が関与する疾患の発症及び進展、原虫感染、並びに炎症反応等の解明のためのモデル動物として利用することができます。

#### 【0021】

さらには、感染症に対する治療薬の候補となるLOX-1アゴニスト及び/または促進剤等のスクリーニングにも利用することができます。即ち、本発明により、本発明のLOX-1遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物を利用した、LOX-1アゴニスト及び/または

促進剤のスクリーニング方法が提供される。より詳細には、(1)本発明のL O X - 1 遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物に対しバベシア原虫を感染させ、(2)該動物に被験物質を投与し、そして(3)原虫による感染症の症状を緩和させる被験物質を選択することにより、L O X - 1 アゴニスト及び／または促進剤をスクリーニングすることができます。このようにしてスクリーニングされたL O X - 1 アゴニスト及び／または促進剤は、原虫感染症治療用組成物として使用することができます。

#### 【0022】

L O X - 1 遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物に対しバベシア原虫を感染させる方法は特に限定されないが、例えば、実施例7のAにおいて示すように、感染赤血球を動物に対して採取する方法を採用することができる。また、本発明における「被験物質」は、どのような化合物であってもよい。例えば、遺伝子ライブラリー、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体ライブラリー、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリー等のライブラリーの物質を挙げることができる。その他、天然物質を被験物質として使用することもできる。天然物質としては、細菌分泌物、微生物、植物及び動物の細胞からの抽出物及びこれらの細胞の培養上清、土壤等を例示することができます。

10

#### 【0023】

原虫による感染症の症状を緩和させる被験物質の選択は、これに限定されないが、実施例において示されるように、パラシテミアの傾向またはヘマトクリット値を調べることによって被験物質の能力を検定して行うことができる。本発明により、L O X - 1 遺伝子欠損動物では、野生型の動物と比べてパラシテミアが急速に上昇する傾向、及び、ヘマトクリット値の減少することが明らかにされた。そこで、本発明のL O X - 1 遺伝子の発現が抑制された動物におけるパラシテミアの上昇を抑制する効果、またはヘマトクリット値の減少を阻止若しくは緩和する被験物質は、原虫感染症の処置に有用と考えられる。

20

#### 【0024】

本発明のL O X - 1 遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物を利用したスクリーニング方法により選ばれたアゴニスト及び／または促進剤は、適宜、薬学的に許容される担体、媒体等と組合せて調製することができる。例えば、安定剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、界面活性剤、緩衝剤（クエン酸、リン酸、及びその他の有機酸等）、キレート剤、防腐剤、結合剤、香料、生理食塩水、等張液、賦形剤、防腐剤、溶解補助剤等を配合することができる。また、必要に応じて、その他の物質として、アスパラギン、アルギニン、グリシン、グルタミン、リシン等のアミノ酸、血清アルブミン、ゼラチン、炭水化物、蛋白質、低分子量ポリペプチド、糖アルコール（マンニトール、ソルビトール等）、糖類（多糖及び单糖）、免疫グロブリン等を含んでもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖またはその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムを含むもの）に混和するが好ましく、さらに、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレンジコール、PEG等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80、HCO-50等）等と併用してもよい。

30

#### 【0025】

また、必要に応じマイクロカプセルに封入して使用することもできる。マイクロカプセルとしては、例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等より構成されるものが公知である。また、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル等を利用したコロイドドラッグデリバリーシステム（Remington's Pharmaceutical Science 16<sup>th</sup> ed., Osiio ed. (1980) 参照）も利用可能である。

40

その他、徐放性薬剤として調製する方法も公知（例えば、Langner et al. (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277; Langner (1982) Chem. Tech. 12: 98-105; Sidman et al. (1983) Biopolymers 22: 547

50

-56: U.S. 778, 919; E.P. 58, 481; E.P. 138, 988 等参照) であり、本発明の組成物及び薬剤に適用し得る。また、該アゴニスト及び促進剤が遺伝子によりコードされ得る場合には、該アゴニストまたは促進剤をコードする遺伝子を公知の遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも可能である。

## 【0026】

患者への投与は、好ましくは注射や点滴により行われ、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射が挙げられる。その他、鼻腔内、経気管支、筋内、経皮、経口等の経路により投与することも可能である。投与量は、患者の体重及び年齢、処置する疾病的種類及び症状、使用する薬剤の種類及び投与経路等により異なるが、当業者であれば各状況に応じた適当な投与量を適宜選択することができる。

10

## 【0027】

本発明の LOX-1 遺伝子欠損動物を使用した実験により、LOX-1 の欠損により内皮機能が 進すこと、浮腫及び炎症が抑制されることが判明した。つまり、LOX-1 の生体内における発現を抑制する物質を得ることができれば、内皮機能の低下が関与する病態の治療薬及び抗炎症剤として有用である。そこで、本発明は、LOX-1 発現抑制剤のスクリーニング方法を提供するものである。LOX-1 アンタゴニスト及び／または阻害剤は、(1) LOX-1 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子を連結したベクターを構築し、(2) 該ベクターを宿主細胞に導入し、(3) 該宿主細胞に被験物質を接触させ、そして(4) レポーター遺伝子の発現を検出することにより選択することができる。

20

## 【0028】

LOX-1 遺伝子の発現制御領域は、LOX-1 をコードする遺伝子(例えば、配列番号 1 に記載の塩基配列)を利用してゲノム DNA から公知の手法によってクローニングしていくことができる。例えば、S1 マッピング法等の転写開始点の特定方法が公知である。また、一般的に、遺伝子の 5' 末端の塩基配列をアロープとしてゲノム cDNA ライブライマーをスクリーニングすることにより発現制御領域がクローニングされることが知られている。そして、得られたクローンは 10 kbP 以上に及ぶ 5' 非翻訳領域を含む場合もあるので、エキソスクレアーゼ処理等により短縮化または断片化して、所望の部位のみを得ることもできる。短縮化または断片化された断片について発現誘導能の有無、発現の強さ、誘導物質等による制御等について検討し、LOX-1 遺伝子の発現制御の活性維持に必要とされる最小単位を決定することもできる。

30

## 【0029】

次に、上述のようにして決定された LOX-1 遺伝子の発現制御領域の下流に作動可能ないようにレポーター遺伝子を連結する。レポーター遺伝子は検出可能なポリペプチドをコードする限り特に限定されない。例えば、ルシフェラーゼ、カタラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、グリーン蛍光蛋白質等の慣用のレポーター遺伝子を使用することができます。LOX-1 遺伝子の発現制御領域及びレポーター遺伝子を組み込むベクターは、所望の宿主細胞におけるレポーターの発現を可能にするものであればよく、特に限定されない。プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ等、様々なベクターを利用することができます。ベクターの宿主細胞への導入を確認するために、本発明の発現ベクターは選択可能なマーク(例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等に対する耐性遺伝子)をコードする遺伝子をコードしてもよい。ベクターへの所望のポリヌクレオチドの導入は、ベクター中の制限酵素部位を利用したりガーゼ反応により容易に行うことができる。

40

## 【0030】

本発明の LOX-1 発現抑制剤のスクリーニングにおいては、構築された発現ベクターは、次に宿主細胞へ導入される。発現ベクターを導入する宿主としては、細菌、真菌類、植物、昆虫、両生類、乳類等由来の原核及び真核細胞を挙げることができ、特に限定されない。また、ベクターを宿主細胞へ導入する方法も公知である。例えば、宿主が細菌の場合には、塩化カルシウム法、エレクトポーレーション法等によりベクターの導入を行うこと

50

ができる。その他、電気パルス穿孔法、リポソーム法、マイクロインジェクション法、リポフェクション、リポフェクタミン、リン酸カルシウム法、D E A E デキストラン法等、多様な方法が公知であり、当業者であれば選択した宿主及び発現ベクターの種類に応じ、適切な方法を選択して、実施することができる。

#### 【0031】

次に、本発明の L O X - 1 発現抑制剤のスクリーニングでは、本発明の発現ベクターを含む細胞に対して被験物質を接触させることで、被験物質は特に限定されず、例えば、遺伝子ライブラリー、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体ライブラリー、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリー等のライブラリーの物質、細菌分泌物、微生物、植物及び動物の細胞からの抽出物及びこれららの細胞の培養上清、土壌等の天然物質を示すことができる。10

#### 【0032】

最後に、レポーター遺伝子の発現を、該遺伝子から転写された m R N A または翻訳されたポリペプチドにより検出する。ポリペプチドを検出する場合には、抗体等のポリペプチドと結合する物質を用いて検出することもできるが、レポーター蛋白質の活性に基づいて検出することもできる。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ、カタラーゼ、β-ガラクトシダーゼ等を採用した場合には、各蛋白質の酵素活性に基づいて検出方法が公知である。また、グリーン蛍光蛋白質をレポーター遺伝子として使用した場合には、発現された蛋白質の蛍光を直接観察することによる検出が可能である。レポーター遺伝子発現の検出結果を被験物質を接触させた場合と、接触させなかつた場合とで比較し、被験物質との接触によりレポーター遺伝子の発現が抑制される物質をスクリーニングする。20

#### 【0033】

また、本発明の L O X - 1 遺伝子欠損動物を使用した実験により、L O X - 1 がバベシア原虫の感染症に関与していることが示唆された。従って、L O X - 1 の生体内における発現を促進する物質を得ることができれば、原虫感染症に対する治療薬あるいは予防薬として有用である。そこで、本発明は、L O X - 1 発現促進剤のスクリーニング方法を提供するものである。このスクリーニング方法は、上記のレポーター系において、レポーター遺伝子発現の検出結果を被験物質を接触させた場合と、接触させなかつた場合とで比較し、被験物質との接触によりレポーター遺伝子の発現が促進される物質をスクリーニングすればよい。30

#### 【0034】

また、L O X - 1 のアンタゴニストや阻害剤あるいはアゴニストや促進剤の候補化合物は、L O X - 1 ポリペプチドに結合する化合物を選択することにより得ることもできる。このようなスクリーニングは、L O X - 1 ポリペプチドとこれに結合する化合物を含むと予想される被検試料とを接触せしめ、該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出し、そして本発明のポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する、ことを含む。

#### 【0035】

スクリーニングに用いられる L O X - 1 ポリペプチドは組換えポリペプチドであっても、天然由来のポリペプチドであってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製ポリペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させた L O X - 1 ポリペプチドは、例えば、精製したポリペプチドとして、可溶型ポリペプチドとして、担体に結合させた形態として、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして、細胞膜上に発現させた形態として、膜画分として被検試料に接触させることができる。40

#### 【0036】

L O X - 1 ポリペプチドを用いて、これに結合するポリペプチドをスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行う50

ことができる。本発明のポリペプチドをコードするDNAを、PSV2neo, PCDNA I, PCD8などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしてはSV40 early Promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol. 8, Academic Press, London, p. 83-141 (1982)), EF-1 $\alpha$  Promoter (Kims Gene 91, p. 217-228 (1990)), CAG Promoter (Niwa et al., Gene 108, p. 193-200 (1991)), RSV LTR Promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p. 684-704 (1987)), SR $\alpha$  Promoter (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8, p. 466 (1988)), CMV immediate early Promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p. 8865-8869 (1987)), SV40 late Promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p. 885-894 (1982)), Adenovirus late Promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK Promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてよい。

10

20

## 【0037】

動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al., Nucl. Acid Res. 15, 1811-1826 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al., Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984))；Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1648 (1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994))；Lamb, B. T. et al., Nature Genetics 5, 22-30 (1993)；Rabindran, S. K. et al. Science 259, 280-284 (1993)) 等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。

30

## 【0038】

特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）を本発明のポリペプチドのN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合ポリペプチドとして本発明のポリペプチドを発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる（実験医学 18, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、B-ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)などの融合ポリペプチドを発現することができるベクターが市販されている。

40

## 【0039】

融合ポリペプチドにすることによりLOX-1ポリペプチドの性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合ポリペプチドを調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン(His-tag)、インフルエンザ凝集素 HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular Stomatitis ウィルス糖タンパク質(VSV-GP)、T7 $\varphi$ ene10 タンパク質(T7- $\varphi$ )、ヒト単純ヘルペスウィルス糖タンパク質(H

50

S V - t<sub>α</sub> ) 、 E - t<sub>α</sub> (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、 LOX - 1 ポリペプチドに結合するポリペプチドのスクリーニングのためのエピトープ - 抗体系として利用できる (実験医学 13 , 85 - 90 (1995)) 。

## 【0040】

免疫沈降においては、これらの抗体を、適當な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は LOX - 1 ポリペプチド、それと結合能を有するポリペプチド、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、 LOX - 1 ポリペプチドに対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。 LOX - 1 ポリペプチドに対する抗体は、例えば、 LOX - 1 ポリペプチドをコードする遺伝子を適當な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたポリペプチドを精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができます。また、合成した LOX - 1 ポリペプチドの部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

10

## 【0041】

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、 Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができます。また、 LOX - 1 ポリペプチドを、例えば、 GST などのエピトープとの融合ポリペプチドとして調製した場合には、グルタチオン - Sepharose 4B などのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、 LOX - 1 ポリペプチドの抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができます。

20

## 【0042】

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies, PP. 511 - 552, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York (1988) ) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

30

## 【0043】

免疫沈降されたポリペプチドの解析には SDS - PAGE が一般的であり、適當な濃度のケルを用いることでポリペプチドの分子量により結合していたポリペプチドを解析することができます。また、この際、一般的には LOX - 1 ポリペプチドに結合したポリペプチドは、クマシーカラーや銀染色といったポリペプチドの通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である <sup>35</sup>S - メチオニンや <sup>35</sup>S - システィンを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のポリペプチドを標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができます。ポリペプチドの分子量が判明すれば直接 SDS - ポリアクリルアミドケルから目的のポリペプチドを精製し、その配列を決定することもできる。

## 【0044】

また、 LOX - 1 ポリペプチドを用いて、該ポリペプチドに結合するポリペプチドを単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法 (Skolnick, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83 - 90) を用いて行うことができる。すなわち、 LOX - 1 ポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが予想される細胞、組織よりファージベクター (λ<sub>t</sub> 11, λAP など) を用いた cDNA ライブライマーを作製し、これを LB - アガロース上で発現させフィルターに発現させたポリペプチドを固定し、精製して標識した LOX - 1 ポリペプチドと上記フィルターとを反応させ、 LOX - 1 ポリペプチドと結合したポリペプチドを発現するブラークを標識により検出すればよい。 LOX - 1 ポリペプチドを標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、 LOX - 1 ポリペプチド又は LOX - 1 ポリペプチドに融合したポリペプチド (例えば GST など) に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

40

## 【0045】

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2 - ハイブリッド

50

システム (Fields, S., and Sternganz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292, Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a Protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612, 「MATCHMARKER TWO-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれもクロンテック社製)、「HybriZAP TWO-Hybrid Vector System」(ストラタジーン社製))を用いて行う方法が挙げられる。

10

## 【0046】

2-ハイブリッドシステムにおいては、LOX-1ポリペプチドまたはその部分ペプチドをSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、LOX-1ポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する(酵母細胞内で本発明のポリペプチドと結合するポリペプチドが発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードするポリペプチドを得ることができる。これによりLOX-1ポリペプチドに結合するポリペプチドまたはその遺伝子を調製することが可能である。

20

## 【0047】

2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS8遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type 1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。2ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、乳動物細胞などを使って行うこともできる。

LOX-1ポリペプチドと結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティクロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、LOX-1ポリペプチドをアフィニティカラムの担体に固定し、ここにLOX-1ポリペプチドと結合するポリペプチドを発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のポリペプチドに結合したポリペプチドを調製することができます。

30

## 【0048】

得られたポリペプチドは、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該ポリペプチドをコードするDNAを得ることができます。

## 【0049】

また、ポリペプチドに限らず、本発明のポリペプチドに結合する化合物(アゴニストおよびアンタゴニストを含む)を単離する方法としては、例えば、固定したLOX-1ポリペプチドに、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、LOX-1ポリペプチドに結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法(Wrightenton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffel K; Dower WJ.. Small Peptides as Potent mimetics of the Protein hormone erythropoietin. Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 P458-64

40

50

、 Verdine GL. . The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996 884 P 11-18. Hogan JC Jr. . Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 884 P 17-9) が当業者に公知である。

## 【0050】

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラスモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラスモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、LOX-1ポリペプチドと被検化合物との間の相互作用を微量のポリペプチドを用いてかっ標識することなく、表面プラスモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えば BIACore、Pharmacia製）。したがって、BIACORE等のバイオセンサーを用いることによりLOX-1ポリペプチドと被検化合物との結合を評価することが可能である。

10

## 【0051】

また、本発明のLOX-1遺伝子欠損動物を使用した実験により、LOX-1の欠損により内皮機能が進すること、浮腫及び炎症が抑制されることが判明したことにより、LOX-1アンタゴニスト及び／または阻害剤は内皮機能が低下している病態の改善並びに抗炎症剤として有用であることが示された。従って、本発明はLOX-1アンタゴニスト及び／または阻害剤を有効成分とする内皮機能の低下が関与する病態の治療薬及び抗炎症剤を提供するものである。LOX-1アンタゴニスト及び阻害剤としては、例えば、中和抗体を挙げることができる（特開2000-109485号公報；国際特許第WO01/64862号パンフレット）。

20

## 【0052】

ここで、中和抗体とは、LOX-1に特異的に結合し、その活性を消失または減退させた抗体を指す。中和抗体は、LOX-1またはその一部を抗原として通常の手法により作製される抗血清、ポリクローナル抗体 (Current Protocols in Molecular Biology (1987) Section 11. 12-11. 18, John Wiley & Sons参照) 及びモノクローナル抗体 (Current Protocols in Molecular Biology (1987) Section 11. 4-11. 11, John Wiley & Sons参照) から選択することができる。また、本発明の中和抗体には、キメラ抗体、一本鎖抗体 (The Pharmacology of Monoclonal Antibody, Vol. 118, Rosenburg and Moore ed., (1994) 269~315頁, Springer Verlag参照)、多特異性抗体 (Le Doussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 587-9; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9; WO93/11161等参照)、ヒト化抗体 (Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6)、ヒト抗体 (WO92/03918; WO94/02602; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56等参照)、並びにFab、Fab'、F(ab')2、Fc及びFv等の抗体断片も含まれる。さらに必要に応じポリエチレングリコール等で修飾されても、検出可能な蛋白質 ((β-ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質、ビオチン等) と融合されてもよい。上述の修飾された抗体及び抗体断片は、中和抗体をパパイン、ペアシン等の酵素で処理し、さらに必要に応じ所望の物質と結合することにより、または、中和抗体をコードする遺伝子を単離し、遺伝子工学的な手法 (Borrebaeck and Larriick (1990) Therapeutic Monoclonal Ant

30

40

50

i bodies. MacMillan Publishers Ltd. 参照)により作製することができます。また、必要に応じ上述の抗体は、その他の蛋白質の精製と同様に公知の方法、例えば、プロテインAまたはプロテインG等のアフィニティーカラム、クロマトマトグラフィーカラム、フィルター、限外過、塩析、透析、等の手段により適宜、精製することができます (Antibodies: A Laboratory Manual. Harlow, David Lane ed. (1988) Cold Spring Harbor Laboratory 参照)。

## 【0053】

内皮機能の低下が関与した疾患としては、高脂血症、糖尿病、高血圧症、及び虚血性疾患等が例示される。虚血性疾患は、例えば、血管損傷、血栓、梗塞、動脈硬化、動脈塞栓、動脈閉塞、動脈等による虚血性疾患を含む。

10

## 【0054】

上述のLOX-1発現抑制剤、並びに抗体等のLOX-1のアンタゴニスト及び/または阻害剤は、治療用組成物または抗炎症剤として、適宜、薬学的に許容される担体、媒体等と組合せて調製することができます。例えば、安定剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、界面活性剤、緩衝剤(クエン酸、リン酸、及びその他の有機酸等)、キレート剤、防腐剤、結合剤、香料、生理食塩水、等張液、賦形剤、防腐剤、溶解補助剤等を配合することができます。また、必要に応じて、その他の物質として、アスパラギン、アルギニン、グリシン、グルタミン、リシン等のアミノ酸、血清アルブミン、ゼラチン、炭水化物、蛋白質、低分子量ポリペプチド、糖アルコール(マンニトール、ソルビトール等)、糖類(多糖及び单糖)、免疫グロブリン等を含んでもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖またはその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムを含むもの)に混和することが好ましく、さらに、適當な溶解補助剤、例えば、アルコール(エタノール等)、ポリアルコール(アロピレンジコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50等)等と併用してもよい。

20

## 【0055】

また、必要に応じLOX-1発現抑制剤、並びに抗体等のLOX-1のアンタゴニスト及び/または阻害剤はマイクロカプセルに封入することができます。マイクロカプセルとしては、例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等より構成されるものが公知である。また、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル等を利用したコロイドドラッグデリバリー・システム(Remington's Pharmaceutical Science 16<sup>th</sup> ed., Oslo ed. (1980) 参照)も利用可能である。その他、徐放性薬剤として調製する方法も公知(例えば、Langer et al. (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277; Langer (1982) Chem. Techn. 12: 98-105; Sidman et al. (1983) Biopolymers 22: 547-56; US 3,773,919; EP 58,481; EP 133,988 等参照)であり、本発明の組成物及び薬剤に適用し得る。また、LOX-1に対する抗体をコードする遺伝子を公知の遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも可能である。

30

## 【0056】

患者への投与は、好ましくは注射や点滴により行われ、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射が挙げられる。その他、鼻腔内、経気管支、筋内、経皮、経口等の経路により投与することも可能である。投与量は、患者の体重及び年齢、処置する疾病的種類及び症状、使用する薬剤の種類及び投与経路等により異なるが、当業者であれば各状況に応じた適當な投与量を適當選択することができます。

40

## 【0057】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるも

50

のではない。

【実施例1】 LOX-1遺伝子の相同組み換え用ベクターの作製

本実施例では、マウスLOX-1遺伝子の相同組み換え用ベクターを構築するために、まずマウスLOX-1ゲノム遺伝子のクローニングを行った。このゲノムDNAを用い、Mansouriらの報告(Nature 336: 848 (1988))に従ってポジティブ/ネガティブセレクションを行うために、ネオマイシン耐性遺伝子およびチミジンキナーゼ遺伝子を挿入した相同組み換え用ベクターを構築した。この際、ネオマイシン耐性遺伝子は、エクソン6の一部、7、8の一部と置き換わるように挿入し、正常なLOX-1が作製できないようにした。以下具体的に説明する。

【0058】

10

A. マウスLOX-1遺伝子のクローニング

SUPERSCRIPT Choice System (GIBCO BRL) を用いて、マウス(C57BL/6)胎盤のcDNAライブラリー(Lambda gt10)を作製し、ウシLOX-1 cDNAの全オーフンリーディングフレームをプローブとして、プラクハイブリダイゼーションを行った。その結果15個の陽性クローンが得られた。そのうちクローンTをシークエンシングし、マウスLOX-1 cDNAの全オーフンリーディングフレーム配列を決定した。こうして得られたマウスLOX-1 cDNAの配列を配列番号1に、またそのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

マウスLOX-1ゲノムDNAは次のようにしてクローニングした。まず、マウスLOX-1 cDNAの全オーフンリーディングフレームをプローブとしてプラクハイブリダイゼーション法によりマウス(129/8V) genomic DNA Lambda FIX IIライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローンDから調製したファージDNAを制限酵素SacIで切断し得られた8kbP、8kbP、5kbPの挿入断片をそれぞれPBluescript II SK(-)のSacIサイトにサブクローニングした(クローンD8、D8、D5)。続いて、クローンD8、D8、D5の塩基配列のシークエンスを行い、エクソン4がD8に、エクソン5から8の前半がD8に、エクソン8の後半がD5に含まれていることを確認した(エクソン8~8の塩基配列を各々、配列番号3~10に示す)。クローンDによりカバーされるLOX-1遺伝子の領域を主要な制限酵素(EcoR V、BamH I、ApaI、Hind III)で切断し、その制限酵素サイトの位置の地図を作製した(図1)。

20

【0059】

30

B. 相同組み換え用ベクターの構築

クローンD8に含まれるマウスLOX-1遺伝子断片をClaIとApaIで切断し生じた約8.8kbPの断片をT4ポリメラーゼにより平滑末端化し、T4ポリメラーゼで平滑末端化したPGEM-NeoのEcoR Iサイトに組み込んだ(P5LOXNeo)。一方、クローンD5に含まれるマウスLOX-1遺伝子断片をKpnIとBamH Iで切断してできる断片のうち約2kbPのものをPBluescript II SK(-)のKpnIサイトとBamH Iサイトの間に組み込んだ。この遺伝子断片をASP718 IとBamH Iにより切り出し、T4ポリメラーゼにより平滑末端化した後、T4ポリメラーゼで平滑末端化したPMC1-tkに組み込んだ(PLOX8kt)。得られたクローンをSalIとXhoIで切断し切り出された断片をP5LOXNeoのSalIサイトに組み込み、相同組み換え用ベクター(LOX-1 targeting Vector)を得た。このベクターは以下のような特徴を持つ(図1)。

40

(i) 第6エクソンの後半から第8エクソンの前半に置き換わる形でネオマイシン耐性遺伝子が挿入されている。

(ii) ネガティブ選択用マークー遺伝子としてチミジンキナーゼ遺伝子を持つ。(iii) 野生型LOX-1遺伝子との相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子の上流が約8.8kb、ネオマイシン耐性遺伝子下流が約2kbである。

【0060】

【実施例2】 相同組み換えによる変異LOX-1遺伝子を持つES細胞の樹立

50

本実施例では、相同組み換え用ベクターを、エレクトロポレーション法により 129/S VJマウスより得られた ES細胞 RW-4に導入し、次いでG418により選択培養を行った。得られたG418耐性コロニーについて、ササンプロットにより相同組み換え体の検定を行った。以下、具体的に説明する。

相同組み換え用ベクター (L O X - 1 Targeting Vector) DNA 25-30μgをXba Iで切斷することにより線状化し、精製した。このDNAをマウスES細胞RW-4、 $8 \times 10^6$  個を含むエレクトロポレーション用緩衝液 (20mM HEPES PH 7.0、137mM NaCl、5mM KCl、6mM D-gluconate、0.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) に懸濁し、Field Strength 185V/cm、Capacitance 500μFの条件で、遺伝子導入を行った。導入後24時間から終濃度200μg/mlのG418 (Geneticin) (SIGMA社 G-9516) で選択培養を行った。ES細胞の培養には、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Gibco/BRL社 11965-084) 培養液に終濃度15%の牛胎児血清 (HYclone社 SH30071)、終濃度2mMのL-グルタミン (Gibco/BRL社 25080-081)、終濃度がそれぞれ100μMの非必須アミノ酸 (Gibco/BRL社 11140-050)、終濃度10mMのHEPES (Gibco/BRL社 15630-080)、終濃度がそれぞれ100U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco/BRL社 15140-122)、終濃度100μMのβ-メルカプトエタノール (SIGMA社 M-7522)、そして終濃度1000U/mlのESGRO (LIF) (Gibco/BRL社 18275-029) を添加したものを使いたい (以下ES培地と記す)。

#### 【0061】

また、ES細胞用のフィーダー細胞としては、E14.5のから単離したMEF (Mouse Embryonic Fibroblast) 細胞を用い、培養液はDMEM (Gibco/BRL社 11965-084) 培養液に終濃度10%の牛胎児血清 (HYclone社 SH30071)、終濃度2mMのL-グルタミン (Gibco/BRL社 25080-081)、終濃度がそれぞれ100μMの非必須アミノ酸 (Gibco/BRL社 11140-050)、終濃度がそれぞれ100U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco/BRL社 15140-122) を添加したものを使いたい (以下MEF培地と記す)。150cm<sup>2</sup> のフラスコでコンフルエントにまで培養されたMEF細胞をトリプシン/EDTA (0.05%/1mM, Gibco/BRL社 25800-047) ではがし、4枚の10cmディッシュ、2枚の24穴プレート、2枚の6穴プレート、6個の25cm<sup>2</sup> フラスコ、2個の75cm<sup>2</sup> フラスコにそれぞれ至適な濃度で撒きなさい。

#### 【0062】

遺伝子導入後5日目から、以下のようにして、出現したG418耐性コロニーを24穴のプレートに継代した。即ち、P-200のピペットマンを用いてG418耐性コロニーを150μlのトリプシン/EDTA溶液を含む96穴のマイクロプレートに移し換え、20分間37℃のインキュベーター内で処理した後、P-1000のピペットマンでピッティングすることによって単一細胞にした。この細胞懸濁液を24穴のプレートに移し換え培養を継続した。2日後、24穴のプレート上の細胞を凍結保存用とDNA抽出用の2つに分割した。即ち、細胞にトリプシン/EDTAを500μl加えて20分間37℃のインキュベーター内で処理し、ES培地を500μl加えてP-1000のピペットマンで静かにピッティングすることによって単一細胞にした。その後、1mlのES培地の入った24穴プレートに細胞懸濁液の半分を移し、元の24穴プレートにもES培地を1ml加えた。さらに2日後、片方の24穴プレートの培地を抜いてから、ES培地に終濃度が10%の牛胎児血清と終濃度が10%のジメチルスルホキシド (DMSO) (Sigma社 D-5879) を添加した凍結用培地を1ml入れて、シールした後-70℃で凍結保存した。

#### 【0063】

10

20

30

40

50

相同組み換え体の検定は、ササンプロッティングによって以下の通りに行った。即ち、コンフルエントの状態まで細胞が増殖した24穴プレートの各ウェルから培地を取り除き、PBSで洗浄した後溶解バッファー(1% SDS、20mM EDTA、20mM Tris pH 7.5)を250μlとプロテイナーゼK(20mg/ml)5μlを加えてよく振り、52℃で1-12時間加温した。溶解したサンプルからフェノール／クロロホルム抽出によりDNAを抽出し、ササンプロッティング用の鑄型DNAとして用いた。

#### 【0064】

ササンプロッティングはネオマイシン耐性遺伝子と置換させることにより欠損させたエクソン5上流のEcoRV-SacIサイトの間の配列およびエクソン8下流のXbaI-APaIサイトの間の配列をプローブとしてササンハイブリダイゼーションを行った。この結果から相同組み換え体であると考えられたクローンは、調べたG418耐性クローン368個中2個(クローン116、クローン244)であった。(図2)

10

#### 【0065】

ササンプロット解析で相同組み換えが確認されたクローンは、凍結保存してあった96穴プレートを37℃に温めることにより融解し、24穴プレートに継代した。この24穴プレートを24時間、37℃で培養後、DMSOと流動パラフィンを除くために培地を交換した。それぞれのクローンが75~90%コンフルエントに達した時点で24穴から6穴プレートに継代した。さらに、6穴プレートに75~90%コンフルエントまで増殖したものが2穴分得られたところで、1穴分は凍結保存し、残りの1穴分は盤胞への注入及びDNA抽出に使用した。

20

#### 【0066】

凍結保存は以下の如く行った。即ち、細胞をESQ PBSで2回リシスした後、0.5mlのESQ TRYPSin(LEXICON社The Mouse Kit)を加え、37℃で15~20分間保温しトリプシン処理を行った後、さらに0.5mlのES細胞培地を加え、35~40回ピペッティングを行いES細胞の塊を完全に解離させた。この細胞懸濁液を1.5ml遠心チューブに移し、さらに1mlのES細胞培地でウェルを洗ってチューブに回収した。チューブを1,000rpmで7分間遠心し、培地を取り除き0.25ml ES細胞培地に再懸濁し、0.25mlの2×凍結培地を加えた。クライオジェニックバイアルにウェルの中身を移し、-80℃で凍らせ、液体窒素中で保存した。

30

#### 【0067】

盤胞への注入及びDNA抽出用の細胞は、ES細胞の塊を完全に解離させた後、その四分の一を盤胞への注入に用い、残りの細胞の三分の一、及び三分の二をそれぞれセラチンコートした60mmディッシュに継代した。前者は細胞がコンフルエントにまで増殖したところでササンプロット解析用のゲノムDNAを抽出し、後者の細胞はコンフルエントにまで増殖したところで8本に分けて凍結した。

#### 【0068】

[実施例3] 組み換えLOX-1遺伝子を持つES細胞によるキメラマウスの作製  
相同組み換えが確認されたES細胞クローンについて、C57BL/6J系マウスの盤胞をホストとしてキメラを作製し、それを偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得た。ホストの採取は、妊娠2日目に、100μM EDTAを添加したWhitten's培地で、卵管と子宮を流すことによって行った。8細胞期または桑実を24時間Whitten's培地で培養し、得られた盤胞を注入に用いた。注入に用いたES細胞は、継代してから2あるいは3日目にTE処理により分散させ、顕微操作に供するまで4℃で静置した。ES細胞の注入用ビペットとしては、COOK IVF社製のPolar body extrusion Pipette(内径約20μm)を用いた。保定用ビペットとしては、外径1mmの微小ガラス管(NARISHIGE)を微小電極作製器(Sutter社P-98/IVF)を用いて細く引き延ばした後、マイクロフォージ(De Fonbrune)を用いて外径50~100μmの部分で切断

40

50

し、さらに口径を10~20μmに加工したもの用いた。注入用ピペットと保定用ピペットは、先端から約5mmの部分を約80度曲げて、マイクロマニピュレーター(LEFT区)に接続した。顕微操作に用いたチャンバーとしては、穴あきスライドグラスにカバーグラスを蜜蠍で接着したものを用い、その上に約20μlの0.8%BSAを加えたHepes-buffered Whitten's 培地のドロップを2個置き、上面を流動パラフィン(ナカライトスク261-37SP)で覆った。一方のドロップには、約100個のES細胞を入れ、他方には拡張盤胞を10~15個入れ、1個あたり10~15個のES細胞を注入した。顕微操作はすべて、倒立顕微鏡下で行った。操作は、1~2時間の培養後、偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に育させた。

10

## 【0069】

C57BL/6J系マウスの盤胞40個に、クローン116ES細胞を注入した結果、40個の盤胞への注入が成功した(成功率100%)。この40個を偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した結果、14匹の産仔が得られた。相同組み換え体に由来する部分の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J系マウスに由来する部分の毛色はブラック色を呈する。得られた産仔のうち、1例が毛色からキメラマウスと判定でき、形態的に雄を示していた。このキメラマウスにおける毛色から判断したES細胞の寄与率は95%であった。

20

## 【0070】

[実施例4] 相同組み換え体の生殖系列への伝達の検定  
実施例3のキメラマウスをC57BL/6J系マウスと交配させ、ES細胞由来の産仔が得られるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞がES細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は、野生色を呈し、C57BL/6J系マウスの盤胞に由来していれば黒色を呈することとなる。交配により野生色のマウスが誕生し、ES細胞の生殖系列への伝達が確認された。

30

## 【0071】

次に、これらの野生色マウスの尾の一部からDNAを抽出し、ササンプロッティングにより、変異LOX-1が伝達されているか調べた。その結果、クローン116ES細胞由来の産仔において変異LOX-1アリルが伝達されていることが確認された。

40

## 【0072】

片側のアリルのLOX-1遺伝子に変異を持つヘテロ欠損マウス同士の交配により、両側のアリルに変異を持つホモ欠損マウスの作製を行った。野生型、ヘテロ欠損そしてホモ欠損マウスの各遺伝子型の解析には、ササンプロッティングによって行った。野生型アリルの存在が検出でき、変異アリルの存在が検出できないものを野生型マウス、その反対に野生型アリルの存在が検出できず、変異アリルの存在が検出できたものをホモ欠損マウス、そして野生型と変異アリル両方が検出された場合をヘテロ欠損マウスと判定した(図3)。

その結果得られた産仔の各遺伝子型は、野生型：ヘテロ欠損：ホモ欠損マウスの比率は、ほぼメンデルの法則通り1:2:1の割合であった。

50

## 【0073】

[実施例5] LOX-1欠損マウスにおけるLOX-1の発現解析  
LOX-1欠損マウスより胸部大動脈を採取し、液体窒素にて凍結後、Polytron PT 1200にてホモジエナライズし、TRIZOL Reagent (Invitrogen)を用いて総RNAを抽出した。野生型(C57BL/6)も同様の手順で総RNAを抽出した。逆転写反応はSuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)を用いて行った。逆転写反応のプライマーとしてランダムヘキサマーを使用し、胸部大動脈から抽出した総RNA 1μgをテンプレートとしてSuperScript II 50Uにて逆転写反応を行い、cDNAを得た。

50

## 【0074】

作製した逆転写反応物の5%をPlatinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 0.5UによるPCRに使用した。マウスLOX-1 cDNA増幅にはセンスプライマー：5'-a<sup>3</sup>Ttccctt<sup>3</sup>tccacaat<sup>3</sup>-3'（配列番号：11）、アンチセンスプライマー：5'-a<sup>3</sup>c<sup>2</sup>ccccc<sup>3</sup>t<sup>2</sup>tttaaaat<sup>3</sup>-3'（配列番号：12）を用い、94℃ 40秒、57℃ 1分、72℃ 1分の条件で35サイクル反応を行った。同時にサンプル量補正の内部標準としてGAPDH cDNAのPCRを行った。センスプライマー：5'-<sup>3</sup>a<sup>2</sup>ccacaat<sup>3</sup>tccat<sup>2</sup>acatcact-3'（配列番号：13）、アンチセンスプライマー：5'-tccacccaccc<sup>3</sup>t<sup>2</sup>tt<sup>3</sup>c<sup>2</sup>t<sup>3</sup>a<sup>2</sup>-3'（配列番号：14）を用い、94℃ 40秒、60℃ 1分、72℃ 1分の条件で25サイクル反応を行った。増幅産物を、エチジウムプロマイドを含む4%アガロースゲルで電気泳動し、278bpのマウスLOX-1増幅産物及び458bpのマウスGAPDH増幅産物をUVランプにて可視化し、CCDカメラにて撮影した。

## 【0075】

その結果、野生型(C57BL/6)においては、278bpのマウスLOX-1 cDNA特異的PCR産物が確認されたが、LOX-1欠損マウスにおいては認められなかった。なお内部標準として用いたGAPDHの増幅産物の電気泳動上のバンド強度は、LOX-1ノックアウトマウスと対照マウスを比較したときほぼ同等であった。従って、LOX-1欠損マウスで確かにLOX-1 mRNAの発現が消失していることが確認された。（図4）。 20

## 【0076】

## [実施例6] 血管内皮細胞依存性弛緩反応の検討

## 1. 溶液の調整

マウスから取り出した血管は、クレブス溶液(118mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mMグルコース)中で実験を行った。次の組成の高カリウム溶液を調整した：62.7mM NaCl, 60mM KCl, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM グルコース。クレブス溶液及び高カリウム溶液は95%O<sub>2</sub>、5%C<sub>O</sub><sub>2</sub>でバーリングを行った。 30

## 【0077】

## 2. 血管のリング標本の作製

10週齢のオスのマウスの胸部を開き、胸部大動脈を心臓ごととりだし、クレブス溶液を入れたシャーレに入れた。顕微鏡下で、組織を引っ張らないように、大動脈を心臓から切り離し、大動脈の周囲についている脂肪組織と結合組織を切り離した。そして大動脈のうち、鎖骨下動脈の分岐部と、肋間動脈の分岐部の間から幅約1mmの大動脈リング標本を取り出し実験に使用した。

## 【0078】

## 3. 実験装置

大動脈リング標本は、5mlのクレブス溶液をいれたチャンバーの中に取り付けられてある2本のフックにかけた。2本のフックのうち1本は装置に固定されており、もう一本は大動脈の収縮、弛緩をフックにかかる圧力として感知し電気信号に変換する等尺性トランスデューサー(UC-5A UFER)につないだ。トランスデューサーからの電気信号はアンプ(PAS-401 Star Medical)によって増幅され記録した。記録はPowerLab System (ADI Instrument)を使用した。 40

## 【0079】

## A. 内皮依存性弛緩の確認

大動脈リング標本にかかる2本のフックの間隔を伸ばすことにより、血管に0.5%の圧力をかけた。血管に圧力をかけると大動脈は元に戻ろうと弛緩するので、大動脈に

かかる圧が0.5%で一定となるまで圧をかけ直して静止張力とした。静止張力が安定した後に90分間静置させてから、チャンバーの溶液を高カリウム溶液に替え高カリウム溶液誘発収縮を起こさせた。この収縮が安定したらチャンバーの溶液をクレブス溶液に戻し血管を静止張力まで弛緩させた。この高カリウム溶液誘発による収縮を8回繰り返し、80分間静置させてから測定に使用した。マウスの大動脈リング標本の内皮依存性の弛緩を評価するためにまず血管を収縮させた。血管収縮物質としてPGF<sub>2α</sub>(WAKO)を使用した。収縮物質によって得られた収縮が安定した後、アセチルコリン(オビソート注第一製薬)により内皮依存性の弛緩をみた。このアセチルコリンによる弛緩が内皮依存性の弛緩かどうかを確かめるために、血管内腔に糸を通すことにより内皮を除去した血管にアセチルコリンを作用させて弛緩が起きないことを、そして内皮を残した血管にNO合成阻害薬であるL-NAM-E(和光純薬)を作用させてから収縮物質により収縮させ、アセチルコリンによる弛緩が起きないことを確認した。(図5上段)より詳細には、内皮を残した野生型マウスの大動脈では弛緩が起きるが(図5上段の左)、NO発生阻害剤であるL-NAM-Eを作用させると弛緩が抑えられ(図5上段の中)、また内皮を除去した血管では弛緩が抑えられた(図5上段の右)。従って、アセチルコリンの投与により血管内皮細胞依存性の弛緩が起きていることが示された。チャート上の数字は投与し作用させたアセチルコリンの濃度を表し、「8」は10<sup>-8</sup>M、「7」は10<sup>-7</sup>Mとなったことを示す。「8」と「7」の間は8×10<sup>-8</sup>Mで、「7」の次は8×10<sup>-7</sup>Mのアセチルコリンを作用させたことを示す。チャート上の略号「SNAP」はNO発生剤S-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン(S-Nitroso-N-acetyl-DL-Penicillamine)、「L-NAM-E」は、NO発生阻害剤NG-ニトロ-Lアルギニンメチルエステルハイドロクロライド(NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride)を示す。

#### 【0080】

##### B. 野生型マウスとLOX-1遺伝子欠損マウスの内皮依存性

野生型マウスとLOX-1遺伝子欠損マウスの内皮依存性の弛緩の比較は、上記のとおり最初に静止張力をかけ、高カリウム溶液による収縮を8回行い、80分間静置させてから行った。まずPGF<sub>2α</sub>により血管を収縮させてから、アセチルコリンにより内皮からのNOの放出による弛緩を血管にかかる張力の変化として測定、比較した。その後チャンバー内のクレブス溶液を数回交替することによりチャンバー内の薬物を洗い流し、80分間安定させた。その後○×LDLを加え、収縮物質により収縮させてアセチルコリンにより、○×LDLを作用させた状態での内皮依存性の弛緩を測定、比較した。(図5中段、下段)

#### 【0081】

その結果、○×LDLを作用させる前後でアセチルコリンによる内皮依存性弛緩を比較すると、○×LDL作用後に野生型マウスでは弛緩が減弱したが、ノックアウトマウスにおいては前後で差が見られなかった。(WT:図5中段、KO:図5下段)。○×LDLを作用させた後でのアセチルコリンによる弛緩の程度を野生型及びノックアウトマウスで各々定量すると、PGF<sub>2α</sub>による収縮を0、ベースラインを100として、アセチルコリン濃度が、10<sup>-8</sup>Mでは各々1.50±0.94と7.62±4.38、8×10<sup>-8</sup>Mでは1.67±0.71と8.27±5.77、10<sup>-7</sup>Mでは1.83±0.27と5.39±2.65、8×10<sup>-7</sup>Mの時に8.77±3.35と6.84±1.78であり、野生型マウスとノックアウトマウスのアセチルコリンによる弛緩に有意差が見られた。

#### 【0082】

##### [実施例7] 原虫感染におけるLOX-1欠損の影響

##### A. Babesia rodhaini及びBabesia microtiの維持

Babesia rodhaini及びBabesia microtiは、ICRマウスにおいて血液継代(blood passage)により維持した。最初に、凍結溶解感染赤血球(frozen-thawed infected red blood ce

10

20

30

40

50

||S : I R B C) をマウス腹腔内に接種した。パラシテミアの割合は、ギムサ染色した血液塗沫標本中の I R B C 数により決定した。50% パラシテミアに達した後、マウスを殺し、血液を回収した。

【0083】

B. Babesia microti 感染

8週齢の L O X - 1 ノックアウト雌マウス及び C 57BL / 6 J 雌マウス、各群4匹ずつに、 $1 \times 10^7$  I R B C を腹膜内接種した。各群についてさらに8匹ずつを非感染コントロールとして用いた。パラシテミアの割合、体重、及びヘマトクリットを集めた。パラシテミアの割合は、ギムサ染色した尾の血液標本中の I R B C 数により決定した。ヘマトクリットはマイクロヘマトクリット法により測定した。パラシテミアの割合については、毎日、決定を行い、ヘマトクリットは感染後、2日毎に測定した。その結果、L O X - 1 欠損マウスに対する *Babesia microti* ( $1 \times 10^7$  I R B C) の感染においては、野生型マウスでは2峰性のパラシテミアのピークを示すのに対し、L O X - 1 欠損マウスでは3峰性に推移することが観察された。尚、ヘマトクリット値の推移には野生型マウスとの差を認められなかった。(図6)

10

【0084】

C. Babesia rodhaini 感染

8週齢の L O X - 1 ノックアウト雌および C 57BL / 6 J 雌マウス、各群6匹ずつに  $1 \times 10^4$  I R B C を腹腔内接種し、*Babesia microti* の場合と同様にパラシテミアおよびヘマトクリット値を測定した。その結果、L O X - 1 欠損マウスに対する *Babesia rodhaini* (10,000 I R B C) 感染後の生存率には野生型マウスとの間に差は認められなかつたが、パラシテミアのより早期かつ急速に上昇する傾向およびヘマトクリット値の有意な減少が観察された。(図7)

20

【0085】

以上のように、マラリアと同様に赤血球に寄生するバベシア原虫の感染実験において、L O X - 1 のこの原虫感染症への関与を示唆する成績が得られた。L O X - 1 は老化赤血球をリガンドとすることが知られているが、バベシア感染赤血球に対する機能の詳細は不明である。

【0086】

[実施例 8] カラゲニン足浮腫に対する受容体反応の検討

30

実験には、6~8週齢の L O X - 1 ノックアウト雄マウス及び正常マウスを用いた。動物は、室温 20~26°C、湿度 40~70%、1日 12 時間照明 (7:00~19:00) の飼育室に収容し、市販の固型飼料 (F-2, 船橋農場) 及び水道水を自由に摂取させて飼育した。なお、動物は 8 日以上予備飼育した後、一般状態の良好なものを利用した。

【0087】

一晩絶食させたマウス (体重 14.0~20.0 g) を1群8匹用い、生理食塩水 (大塚製薬工場) に溶解した 0.05 mL の 1% カラゲニン (L O T No. P-18, 逗子化学) を右側後肢足 皮下に注射した。その 0.5、1 及び 3 時間後に足容積を測定し、起炎剤投与前の値から浮腫率 (%) を算出した (表1、図8)。

40

【0088】

【表1】

時間 (hr)	0	0.5	1	3
WT	0	45.6	44	64.6
		6.4	7.7	5.7
KO	0	13.8	28.8	48.1
		3.4	4.8	5

10

## 【0089】

成績は平均値±標準誤差で示す。カラゲニン足浮腫法の場合、正常マウス群及びノックアウトマウス群の2群間検定はBartlett検定（またはF検定）による等分散性の検定を行い、Studentのt検定を行った。その結果、正常マウスにおけるカラゲニン注射0.5、1及び3時間後の浮腫率はそれぞれ45.6±6.4、44.0±7.7及び64.6±5.7%であった。一方、ノックアウトマウスにおける浮腫率はそれぞれ13.8±3.4、28.8±4.8及び48.1±5.0%と正常マウスに比べ低く、特にカラゲニン注射0.5及び3時間後においては浮腫率の有意な低下が観察された。

20

## 【0090】

また、3時間後の足容積測定後に動物を頸椎脱臼により屠殺し、起炎剤投与足の足根部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定後、ギ酸脱灰を行い、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を作製し、病理組織学的検査を実施した（表2、図9）。

## 【0091】

【表2】マウス足根部皮下の病理組織学的所見

使用動物	カラゲニン							
	正常マウス				ノックアウトマウス			
	動物数	8	8					
程度	-	+	++	+++	-	+	++	+++
皮下組織/筋層 の浮腫			7	1		4	4	
皮下組織/筋層の 炎症性細胞浸潤		1	7			7	1	
皮下組織の出血		8			1	6	1	

80

40

変化程度：-：変化なし、+：軽度、++：中程度、+++：高度

## 【0092】

その結果、正常マウスに共通した所見として、足根部の皮下組織及び筋層において中等度の浮腫並びに炎症性細胞浸潤がやや広範囲に亘って観察され、さらに出血も散見された。一方、ノックアウトマウスにおいても正常マウスと同質の変化が観察されたが、特に皮下組織及び筋層における浮腫並びに炎症性細胞浸潤の程度は正常マウスに比べ軽減しており、8例中7例における炎症反応は何れも軽度なものであった。

以上、ノックアウトマウス及び正常マウスにおけるカラゲニン足浮腫に対する作用を検討

50

した結果、浮腫率及び病理組織所見から見て、ノックアウトマウスでは正常マウスに比べ炎症反応の抑制が示唆された。

【0098】

【発明の効果】

今回作製されたL O X - 1 遺伝子欠損マウスを用いた解析により、L O X - 1 アンタゴニストは内皮機能が低下している病態の改善に有用であることが明らかとなつた。また、原虫の感染にあってもL O X - 1 が関与していることが明らかとなつた。さらに、L O X - 1 遺伝子欠損マウスでは炎症反応の抑制作用が認められ、L O X - 1 の炎症反応との関連が示唆された。このように、本発明のL O X - 1 遺伝子欠損動物は、L O X - 1 の新規機能を明らかにしていくために有用なモデル動物である。また、本発明のL O X - 1 遺伝子の機能がノックアウトされたマウスは、動脈硬化の発症、進展、その他未知のL O X - 1 遺伝子の役割を探る上で有用なモデルマウスとなる。

10

【0094】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

〈110〉 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

20

NATIONAL CARDIOVASCULAR CENTER RESEARCH INSTITUTE

〈120〉 LOX-1 gene deleted animal

〈130〉 C1-A0234

〈160〉 7

〈170〉 PatentIn Ver. 2.1

10

〈210〉 1

〈212〉 DNA

〈213〉 Murinae gen. sp.

〈400〉 1

ctcttagcag gaatttggag atgacttttgc atgacaagat gaaggcttgcg aatgacgagc 60  
ctgatcgaa gtcatgtggc aagaaggcta aaggctgtca ttgccttct tccccatgg 120  
ggttccctgc tgctatgact ctggtcatcc tctgcctgggt gttgtcagtg acccttattg 180  
tacagtggac acaattacgc caggtatctg acctcttaaa acaataccaa gcgaacctta 240  
ctcagcagga tcgtatccctg gaagggcaga tggtagccca gcagaaggca gaaaacactt 300  
cacaggaatc aaagaaggaa ctgaaaggaa agatagacac cctcacccag aagctgaacg 360  
agaaatccaa agagcaggag gagcttctac agaagaatca gaacctccaa gaagccctgc 420  
aaagagctgc aaactcttca gaggagtccc agagagaact caagggaaag atagacacca 480  
tcacccggaa gctggacgag aaatccaaag agcaggagga gcttctgcag atgattcaga 540  
acctccaaaga agccctgcag agagctgcaa actcttcaga ggagtccca agagaactca 600  
aggaaaagat agacaccctc accttgaagc tgaacgagaa atccaaagag caggaggagc 660  
ttctacagaa gaatcagaac ctccaagaag ccctgcaaag agctgcaaac tttcaggta 720  
cttgtccaca agactggctc tggcataaaag aaaactgtta cctcttccat gggccctta 780  
gctggaaaa aaaccggcag acctgccaat ctgtgggtgg ccagttacta caaattaatg 840  
gtcagatga tctgacattc atcttacaag caatttccca taccacctcc ccgttctgga 900  
ttggattgca tcggaagaag cctggccaaac catggctatg ggagaatgga actcccttga 960

20

80

40



tcatttgtt a tctgtgtt t gttgtatgcg atttgggttg tttttatttt gggcaccta 2760  
 caaataaagc tgctatggat gtccatggac aaggctaata tcttagtaa gcacctacga 2820  
 gtaagatgct tgggtcattc agtgtggaa tatatggttt gctattttaa ccattctgt 2880  
 ttgaaaacat taattttttt attttggaaa tcaattttt aaaaaatttag tctatttac 2940  
 atctcaaccc cagtttcct tccctcttc ctctcaacct tctcccacct tctctccctg 3000  
 accccatcca cccctccccc ctttctctcc agaagagggg aggcctcccc tggatgccaa 3060  
 ccagcctcag catctcaagt tacagtaaga ataggtttgt ctctcttgt gaaaatctt 3120  
 attttagat ttatctatta tatatgcagt actttgttg cacatatgtt ttggtaccat 3180  
 gtacatgaat ggtaccagag aaagtccagaa gaggccattt tttttctgg gactggaaatt 3240  
 acagacggtt ttgaacaatc ctatagactc tggaaactga acccaggccc tctggaaagg 3300  
 caagcagtc tcttaacccc tgagccattt ctctggcct ttttagcaatttttataata 3360  
 tataactgtt tataatttgc ttttagctc aaagtttttta agtgtcaaattt agtcttggat 3420  
 ttatatttcat gttatcactg tctgtacaat ttctgtgtatg aaataactga gcataatattt 3480  
 tgagaattttt gttttttttaa attttaatc tgaaggattt acatatttga gaataaaaaac 3540  
 cagccagata tgaaaaaaaaa a 3561

10

20

80

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Murinae gen. sp.

&lt;400&gt; 2

Met Thr Phe Asp Asp Lys Met Lys Pro Ala Asn Asp Glu Pro Asp Gln

1

5

10

15

Lys Ser Cys Gly Lys Lys Pro Lys Gly Leu His Leu Leu Ser Ser Pro

20

25

30

40

Trp Trp Phe Pro Ala Ala Met Thr Leu Val Ile Leu Cys Leu Val Leu  
35 40 45

Ser Val Thr Leu Ile Val Gln Trp Thr Gln Leu Arg Gln Val Ser Asp  
50 55 60

Leu Leu Lys Gln Tyr Gln Ala Asn Leu Thr Gln Gln Asp Arg Arg Ile Leu  
65 70 75 80 10

Glu Gly Gln Met leu Ala Gln Gln Lys Ala Glu Asn Thr Ser Gln Glu  
85 90 95

Ser Lys Lys Glu leu Lys Gly Lys Ile Asp Thr Leu Thr Gln Lys Leu  
100 105 110

Asn Glu Lys Ser lys Glu Gln Glu Glu Leu Leu Gln Lys Asn Gln Asn  
115 120 125

Leu Gln Glu Ala leu Gln Arg Ala Ala Asn Ser Ser Glu Glu Ser Gln  
130 135 140

Arg Glu Leu Lys Gly Lys Ile Asp Thr Ile Thr Arg Lys Leu Asp Glu  
145 150 155 160

Lys Ser Lys Glu Gln Glu Glu Leu Leu Gln Met Ile Gln Asn Leu Gln  
165 170 175

Glu Ala Leu Gln Arg Ala Ala Asn Ser Ser Glu Glu Ser Gln Arg Glu  
180 185 190 40

Leu Lys Gly Lys Ile Asp Thr Leu Thr Leu Lys Leu Asn Glu Lys Ser  
195 200 205

Lys Glu Gln Glu Glu Leu Leu Gln Lys Asn Gln Asn Leu Gln Glu Ala  
210 215 220

Leu Gln Arg Ala Ala Asn Phe Ser Gly Pro Cys Pro Gln Asp Trp Leu  
225 230 235 240

Trp His Lys Glu Asn Cys Tyr Leu Phe His Gly Pro Phe Ser Trp Glu  
245 250 255

Lys Asn Arg Gln Thr Cys Gln Ser Leu Gly Gly Gln Leu Leu Gln Ile  
260 265 270

Asn Gly Ala Asp Asp Leu Thr Phe Ile Leu Gln Ala Ile Ser His Thr  
275 280 285

Thr Ser Pro Phe Trp Ile Gly Leu His Arg Lys Lys Pro Gly Gln Pro  
290 295 300

Trp Leu Trp Glu Asn Gly Thr Pro Leu Asn Phe Gln Phe Phe Lys Thr  
305 310 315 320

Arg Gly Val Ser Leu Gln Leu Tyr Ser Ser Gly Asn Cys Ala Tyr Leu  
325 330 335

Gln Asp Gly Ala Val Phe Ala Glu Asn Cys Ile Leu Ile Ala Phe Ser  
340 345 350

Ile Cys Gln Lys Lys Thr Asn His Leu Gln Ile

355

360

<210> 3

<211> 93

<212> DNA

10

<213> Murinae gen. sp.

<400> 3

ctcttagcag gaatttggag atgacttttgc atgacaagat gaaggctgcg aatgacgagc 60

ctgatcagaa gtcatgtggc aagaaggcta aag 93

20

<210> 4

<211> 102

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<400> 4

gtctgcattt gctttttcc ccatgggtt tccctgtgc tatgactctg gtcatctct 60

gcctggtgtt gtcagtggacc cttattgtac agtggacaca at 102

80

<210> 5

<211> 246

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

40

**<400> 5**

tacgccaggt atctgacctc ttaaaacaat accaagcgaa ccttactcag caggatcgta 60  
 tccctggagg gcagatgtta gcccaggcaga aggcagaaaa cacttcacag gaatcaaaga 120  
 aggaactgaa aggaagata gacaccctca cccagaagct gaacgagaaa tccaaagagc 180  
 aggaggagct tctacagaag aatcagaacc tccaagaagc cctgcaaaga gctgcaaact 240  
 cttag 246

10

**<210> 6**

**<211> 138**  
**<212> DNA**  
**<213> Murinae gen. sp.**

**<400> 6**

aggagtcccc gagagaactc aagggaaaga tagacaccat cacccggaag ctggacgaga 60  
 aatccaaaga gcaggaggag ctctgcaga tgattcagaa cctccaagaa gccctgcaga 120  
 gagctgaaa ctcttcag 138

20

**<210> 7**

**<211> 138**  
**<212> DNA**  
**<213> Murinae gen. sp.**

**<400> 7**

aggagtcccc gagagaactc aagggaaaga tagacaccct caccttgaag ctgaacgaga 60  
 aatccaaaga gcaggaggag ctctacaga agaatcagaa cctccaagaa gccctgaaa 120  
 gagctgaaa cttttcag 138

30

40

〈210〉 8

〈211〉 137

〈212〉 DNA

〈213〉 Murinae gen. sp.

〈400〉 8

gtccttgcac acaagactgg ctctggcata aagaaaactg ttaccttttc catggccct 60  
ttagctggga aaaaaaccgg cagacctgcc aatcttggg tggccagttt ctacaaatta 120  
atggtgaga tgatctg 137

10

〈210〉 9

〈211〉 116

〈212〉 DNA

20

〈213〉 Murinae gen. sp.

〈400〉 9

acattcatct tacaagcaat ttccataacc acctccccgt tctggattgg attgcattgg 60  
aagaaggccatg gccaaccatg gctatggag aatggaaactc ctttgaattt tcaatt 116

30

〈210〉 10

〈211〉 2582

〈212〉 DNA

〈213〉 Murinae gen. sp.

〈400〉 10

cttaagacc agggcggtt cttacagct atattcatca ggcaactgtg catacctca 60  
agacggagct gtgttcgcgtg aaaactgcattt tctaatttgcattt ttcagcatat gtcagaagaa 120

40



tgggtcattc agtgtggaa tatatggttg gctatTTAA ccattccigt ttgaaaacat 1920  
taatTTTTT atTTTgaaa tcaatTTTTT aaaaaattag tctatTTac atctcaaccc 1980  
cagTTCTCT tcTCCCTCt ctctcaacct tctcccacct tctcccttg accccatcca 2040  
ccCTCCtCC cTTCTCTCC agaagaggGGG aggCCtCCCA tggatGCCAA ccAGCCTAG 2100  
catctcaagt tacagtaaga ataggTTTGT ctTCTCTGT gaaaatCTTA atTTTtagat 2160  
ttatctatta tatatgcagt actTTGCTTG cacatATGTA ttggTACCAT gtacatGAAT 2220  
ggTACCAgAG aaAGTCAGAA gaggCCATTG tATTTCTGG gACTGGAAATT acAGACGGTT 2280  
ttgaacaATC ctatAGACTC tggAACTGA accCAGGTCC tCTGGAAAGG caAGCAGTGC 2340  
tCTTAACCCC tgAGCCATTt CTTCtGGCCT tttAGCAATT ttTATTAATA tataACTGTG 2400  
tataATTGCA ctTTAGCTC aaAGTtCTTA agtGTCAAAT agtCTTGGAT ttATTTCAT 2460  
gttatcactg tctgtacaat ttctgtgatg aaataactga gcataTATTt tgagaATTtG 2520  
gtTTTCTTAA atTTTAAATC tgaaggATTt acatATTtGA gaataAAAAC cAGCCAGATA 2580  
tg 2582

10

20

⟨210⟩ 11  
⟨211⟩ 22  
⟨212⟩ DNA  
⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:sense primer  
for mouse lox-1 cDNA amplification

80

⟨400⟩ 11  
aggTCTTGT ccacaAGACT gg

22

〈210〉 12  
〈211〉 23  
〈212〉 DNA  
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:antisense  
primer for mouse LOX-1 cDNA amplification

10

〈400〉 12  
acgccccctgg tcttaaagaa ttg

23

〈210〉 13  
〈211〉 22  
〈212〉 DNA  
〈213〉 Artificial Sequence

20

〈220〉  
〈223〉 Description of Artificial Sequence:sense primer  
for GADPH cDNA amplification

30

〈400〉 13  
gaccacagtc catgacatca ct

22

〈210〉 14  
〈211〉 21  
〈212〉 DNA

40

**<213> Artificial Sequence**

**<220>**

**<223> Description of Artificial Sequence:antisense  
primer for GAPDH cDNA amplification**

**<400> 14**

**tccaccaccc tggtgctgt a g**

**21**

**10**

**【図面の簡単な説明】**

【図 1】上より、クローン D に含まれるマウス L O X - 1 遺伝子の制限酵素サイト、相同組換用ベクターの構造、相同組み換え後のマウス L O X - 1 遺伝子の構造、相同組み換え体解析のためのササンプロット用プローブをそれぞれ示す図である。

【図 2】図 1 のプローブのうち 5' 上流側の配列を有するプローブ、および 3' 下流側の配列を有するプローブを用いた E S 細胞ゲノム DNA 断片のササンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

【図 3】マウスゲノム DNA 断片の図 1 のプローブのうち 5' 上流側の配列を有するプローブを用いたササンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

【図 4】マウス L O X - 1 cDNA 及びマウス G A P D H cDNA の R T - P C R による増幅産物の電気泳動結果を示す図である。

【図 5】O X L D L による血管内皮細胞依存性弛緩反応の減弱を野生型マウス及び L O X - 1 遺伝子欠損マウスで比較した結果を示す図である。

【図 6】B a b e s i a m i c r o t i 感染後のパラシテミアを野生型マウス (C 5 7 B L / 6 J) 及び L O X - 1 遺伝子欠損マウス (L O X - 1 K O) で比較した結果を示す図である。

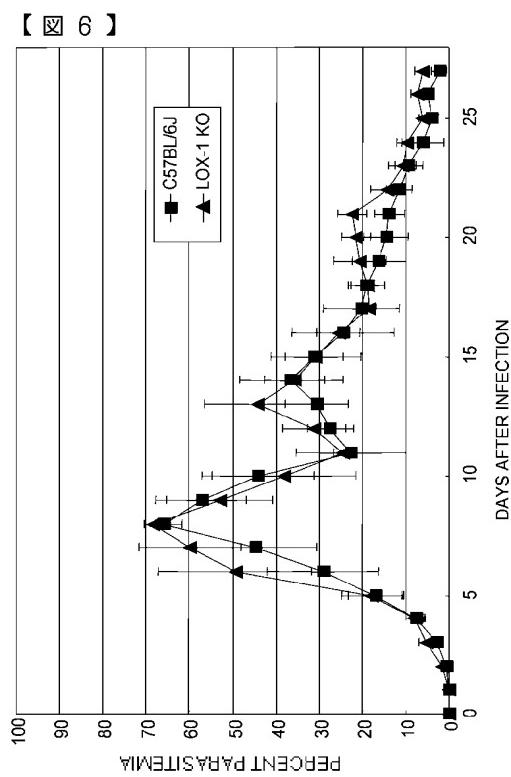
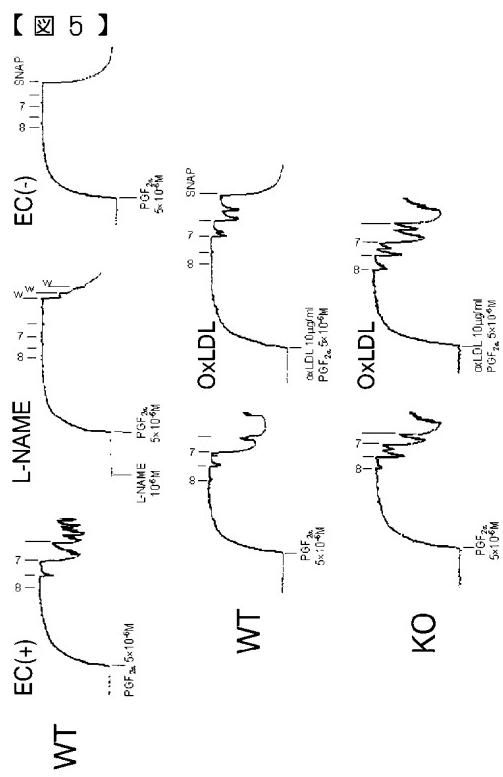
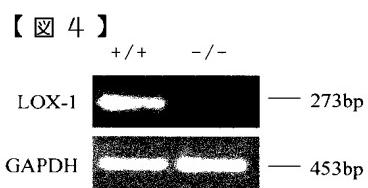
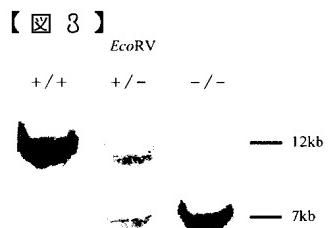
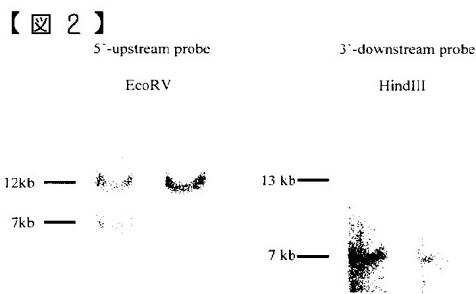
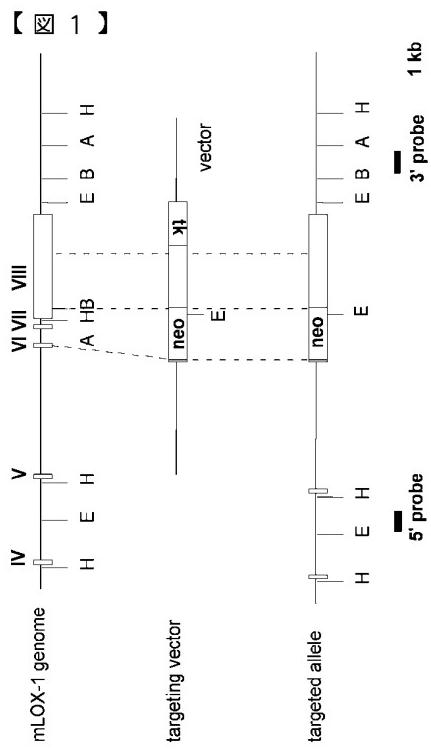
【図 7】B a b e s i a r o d h a i n i 感染後のパラシテミアを野生型マウス (C 5 7 B L / 6 J) 及び L O X - 1 遺伝子欠損マウス (L O X - 1 K O) で比較した結果を示す図である。

【図 8】カラゲニン処理後の足容積を野生型マウス (W T) 及び L O X - 1 遺伝子欠損マウス (K O) で比較した結果を示す図である。

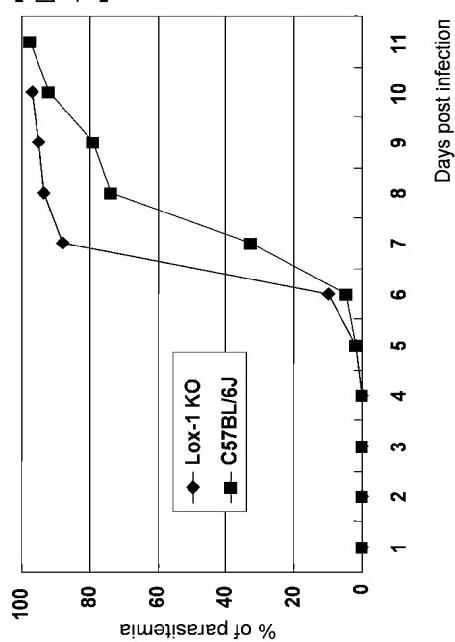
【図 9】野生型マウス (1 ~ 3) 及び L O X - 1 遺伝子欠損マウス (4 ~ 6) のカラゲニン処置足根部の組織写真を示す。1 及び 4 : × 5 0、2 及び 5 は各々 1 及び 4 を拡大した写真 (× 1 2 5)、3 及び 6 は各々写真 2 及び 5 を拡大した写真 (× 2 5 0) である。▲は炎症性細胞浸潤、矢印は浮腫を示す。

**20**

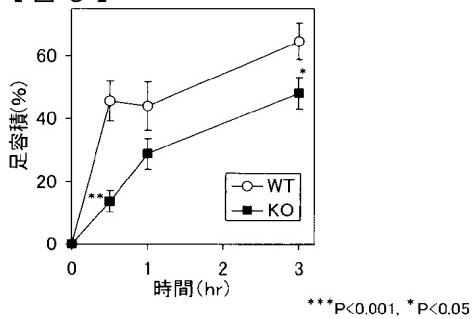
**80**



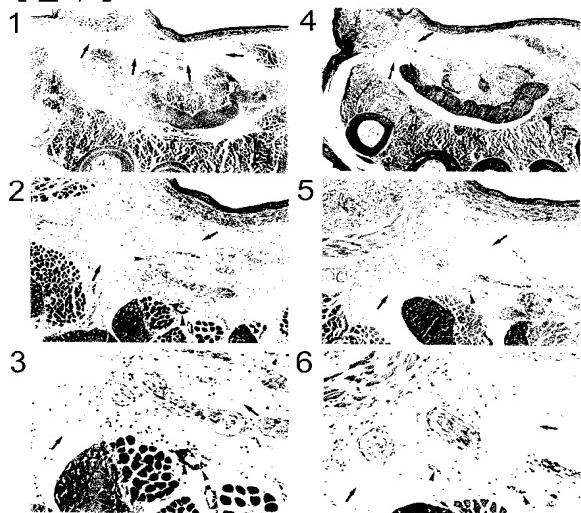
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テマコード(参考)
A 61 P 7/02	A 61 P 7/02	4C085
A 61 P 9/10	A 61 P 9/10	
A 61 P 9/12	A 61 P 9/10	101
A 61 P 29/00	A 61 P 9/12	
A 61 P 33/00	A 61 P 29/00	
A 61 P 43/00	A 61 P 33/00	
C 12 N 5/10	A 61 P 43/00	111
C 12 Q 1/02	C 12 Q 1/02	
G 01 N 33/15	G 01 N 33/15	X
G 01 N 33/48	G 01 N 33/48	N
G 01 N 33/50	G 01 N 33/50	X
// A 61 K 39/395	C 12 N 5/00	XNAB
	A 61 K 39/395	D
	A 61 K 39/395	N

(72)発明者 川瀬 洋介

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 株式会社中外医科学研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB24 CB01 CB17 DA13 DA36 FB02  
 4B024 AA01 AA11 CA02 DA02 HA11  
 4B063 QA18 QR72 QR74  
 4B065 AA91 AB01 BA02 CA44 CA46  
 4C084 AA17 MA01 NA14 XA402 XA422 XA452 XA542 XB382 XC382 XC352  
 XC412  
 4C085 AA13 AA14 CC32 EE01 GG01